

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 5 5 2 号	学位授与年月日	平成 21 年 7 月 17 日
氏 名	浅 井 正 嘉		
論文題目	Extracellular acidosis suppresses endothelial function by inhibiting store-operated Ca^{2+} entry via non-selective cation channels (細胞外アシドーシスは非特異的陽イオンチャネルを介したストア応答性 Ca^{2+} 流入を抑制することにより内皮機能を低下させる)		

博士(医学) 浅井 正 嘉

論文題目

Extracellular acidosis suppresses endothelial function by inhibiting store-operated Ca^{2+} entry via non-selective cation channels

(細胞外アシドーシスは非特異的陽イオンチャネルを介したストア応答性 Ca^{2+} 流入を抑制することにより内皮機能を低下させる)

論文の内容の要旨

[目的]

血管内皮は臓器血流や透過性の調節、血栓形成や白血球浸潤の防御など、血管や組織の恒常性の維持に重要であることが報告されている。これらの血管内皮機能は、血管内皮で産生される一酸化窒素 (nitric oxide: NO)、プロスタグランジン I_2 (prostaglandin I_2 : PG I_2) といった内皮由来血管弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) によって制御され、EDRF は内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化によって調節されている。

アシドーシスは、低酸素、虚血、代謝異常などの様々病態により引き起こされる。このような病態下において、血液と絶えず接する血管内皮は酸性環境に最も曝露されやすいが、アシドーシスにおける血管内皮機能については、未だ不明な点が多い。本研究では、アシドーシス下の血管内皮機能を明らかにするため、酸性下における血管内皮 Ca^{2+} 応答と EDRF 産生について検討することを目的とした。

[方法]

対象として初代培養ブタ大動脈血管内皮細胞を使用した。血管内皮細胞 Ca^{2+} 応答のアゴニストとして G 蛋白共役型受容体依存性のブラジキニン (BK) と細胞内 Ca^{2+} ストア部位の Ca^{2+} ATPase 阻害剤のタブシガルギン (TG) を用いた。細胞内 pH (pH_i) は蛍光色素である BCECM/AM を、細胞内 Ca^{2+} 濃度は蛍光色素 fura-2/AM を用いて測定した。NO の測定には蛍光色素の DAF-FM/DA を用い、PGI $_2$ の測定には、その代謝産物である 6-ketoPGF $_{1\alpha}$ を酵素免疫測定法により測定した。細胞外 pH (pH_o) の変化には pH 6.4、6.9 および 7.4 に調整した HEPES 溶液を使用し、細胞内 pH (pH_i) の変化にはプロピオン酸 (20 mmol/L) を用いた。

[結果]

- (1) BK (10 nmol/L) 刺激による内皮細胞内 Ca^{2+} 応答は、 pH_o 6.9、6.4 において $30 \pm 15\%$ 、 $80 \pm 4\%$ 減弱した ($P < 0.001$ vs. pH_o 7.4)。また、TG (1 $\mu\text{mol/L}$) 刺激による内皮細胞内 Ca^{2+} 応答は、 pH_o 6.9、6.4 において $23 \pm 9\%$ 、 $97 \pm 1\%$ 減弱した ($P < 0.001$ vs. pH_o 7.4)。また、これら酸性下における内皮細胞内 Ca 応答抑制作用は pH_o 7.4 により直ちに解除された。
- (2) BK 刺激による NO 産生は、 pH_o 6.9、6.4 において $38 \pm 3\%$ 、 $91 \pm 2\%$ 抑制された ($P < 0.001$ vs. pH_o 7.4) PGI $_2$ 産生は、 pH_o 6.9、6.4 において $55 \pm 15\%$ 、 $77 \pm 29\%$ 抑制された ($P < 0.001$ vs. pH_o 7.4) また、これら酸性下における NO 産生抑制作用は pH_o 7.4 により直ちに解除された。
- (3) 細胞外 Ca^{2+} free 溶液においては、BK および TG によって惹起される細胞内 Ca^{2+} ストア部位からの Ca^{2+} 放出は、 pH_o 6.4、6.9 の影響を受けなかった。
- (4) pH_o 7.4 のプロピオン酸は、 pH_i を 7.3 から 6.9 まで低下させた。しかし、この細胞内アシドーシス

は、BK と TG による Ca^{2+} 応答、および NO 産生に影響を与えなかった。

[考察]

血管内皮細胞内 Ca^{2+} 応答はストア応答性 Ca^{2+} 流入と呼ばれる機序によって調節されている。これは、細胞内 Ca^{2+} ストア部位から細胞質への Ca^{2+} 放出によって生じたストア内の Ca^{2+} 枯渇が、細胞外からの Ca^{2+} 流入を惹起すると考えられている。本実験において、細胞外アシドーシスが、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出に影響せず、細胞外からの Ca^{2+} 流入のみを可逆的に抑制することが確認された。また、細胞外アシドーシスによる血管内皮 Ca^{2+} 応答抑制により、NO、 PGI_2 といった EDRF 産生も抑制されることが示された。

血管内皮細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞間結合を変化させ血管透過性を亢進させる。本実験結果から、心筋梗塞などの虚血部位で生ずる局所的アシドーシスは、血管内皮細胞内 Ca^{2+} 応答の低下により血管透過性を抑制し、隣接する組織に対し保護的に作用していることが予想された。また、虚血からの再灌流において、アシドーシスからの急激な回復は、血管内皮細胞内への急峻な Ca^{2+} 濃度の上昇とそれに伴う EDRF の過剰産生により、組織血流の過灌流や血管透過性の亢進が生じ、組織再灌流障害の誘引となり得ることが考えられた。

細胞外アシドーシスがストア応答性 Ca^{2+} 流入を抑制する機序については、今回明らかにされなかった。 Na^+/H^+ 交換機構を介して、細胞外 H^+ によって惹起される細胞内 Na^+ 濃度の減少が、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) を介した外向きの Ca^{2+} 電流を刺激していることが考えられる。これがアシドーシスにおける細胞内への Ca^{2+} 流入抑制の一因となる可能性が考えられた。しかし、本実験で、細胞外アシドーシスで細胞内 pH が影響を受けなかったことを確認しており、 Na^+/H^+ 交換機構が作動しているとは言い難い。さらに、我々は、 Na^+ を Li^+ に置換えた細胞外溶液下で、TG による細胞内 Ca^{2+} 応答に影響されないことを以前に報告しており、血管内皮細胞 Ca^{2+} 応答に NCX が関与する可能性は極めて少ないと考えている。これらのことから、アシドーシスにおける Ca^{2+} 応答抑制においても NCX が関与している可能性は少ないと考えられた。

[結論]

細胞内でなく細胞外のアシドーシスは、ストア応答性 Ca^{2+} 流入を抑制することにより、血管内皮機能を抑制することが明らかにされた。これらの結果は、アシドーシスを生じる様々な病態の解明に有用であると思われる。

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞は様々な機構により、血管の透過性、血流量を積極的に調節し、臓器や生体の恒常性の維持に関わる。一酸化窒素 (nitric oxide: NO) とプロスタグランジン I_2 (prostaglandin I_2 : PGI_2) も血管内皮で産生される血管弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) として血流量の調節に関わるが、その合成はいずれも内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) により調節されている。血管内皮 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答は、刺激に応じて細胞内 Ca^{2+} ストア部位から細胞質へ Ca^{2+} が放出されることにより生じたストア内の Ca^{2+} 枯渇が、非特異的二価陽イオンチャネルを通じた細胞外からの Ca^{2+} 流入を惹起する (store-operated Ca^{2+} entry: SOCE) ことによると考えられている。血管閉塞時には、末梢組織と共に血管内皮も酸性環境に曝露されやすいが、アシドーシスにおける血

管内皮機能については詳細な検討がない。本研究では、アシドーシス下の血管内皮機能を明らかにするため、酸性下における血管内皮 Ca^{2+} 応答と EDRF 産生について検討した。

[材料ならびに方法]

初代培養ブタ大動脈血管内皮細胞を使用した。血管内皮細胞 Ca^{2+} 応答のアゴニストとして G 蛋白共役型受容体依存性のブラジキニン (BK) と細胞内 Ca^{2+} ストア部位の Ca^{2+} ATPase 阻害剤のタプシガルギン (TG) を用いた。細胞内 pH (pH_i) は蛍光色素である BCECM/AM を、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ は蛍光色素 fura-2/AM を用いて測定した。NO 産生量は蛍光色素の DAF-FM/DA を用いて測定した。PGI₂ 産生量は、その代謝産物である 6-ketoPGF_{1 α} を酵素免疫測定法により測定することにより推定した。細胞外 pH (pH_o) は pH 6.4、6.9 および 7.4 に調整した HEPES/NaOH 緩衝液を使用し変化させ、細胞内 pH (pH_i) はプロピオン酸 (20 mM) を用いて変化させた。

[結果と考察]

- (1) BK (10 nM) 刺激による内皮 $[\text{Ca}^{++}]_i$ 応答は、 pH_o 6.9、6.4 においては、 pH_o 7.4 に比し $30 \pm 15\%$ 、 $80 \pm 4\%$ 減弱した ($P < 0.001$)。また TG (1 μM) 刺激による内皮 $[\text{Ca}^{++}]_i$ 応答は、 pH_o 6.9、6.4 において pH_o 7.4 に比し、 $23 \pm 9\%$ 、 $97 \pm 1\%$ 減弱した ($P < 0.001$)。これら酸性下における内皮細胞内 Ca 応答抑制作用は pH_o 7.4 に戻すことにより直ちに解除された。
- (2) BK 刺激による NO 産生は、 pH_o 6.9、6.4 において pH_o 7.4 に比し、 $38 \pm 3\%$ 、 $91 \pm 2\%$ 抑制された ($P < 0.001$)。PGI₂ 産生は、 pH_o 6.9、6.4 において pH_o 7.4 に比し、 $55 \pm 15\%$ 、 $77 \pm 29\%$ 抑制された ($P < 0.001$)。また、これら酸性下における NO 産生抑制作用は pH_o 7.0 に戻すことにより直ちに解除された。
- (3) 細胞外 Ca^{2+} free 下に BK および TG により刺激すると、細胞内 Ca^{2+} ストア部位からの Ca^{2+} 放出による内皮 $[\text{Ca}^{++}]_i$ 応答のみが認められ、これは、 pH_o 6.4、6.9 の影響を受けなかった。
- (4) 上記細胞外 pH の変動時には細胞内 pH の変動は認められなかったが、 pH_o 7.4 のプロピオン酸処理により、 pH_i は 7.3 から 6.9 まで低下した。しかしこの細胞内アシドーシスは、BK と TG による Ca^{2+} 応答、および NO 産生に影響を与えなかった。

[考察]

血管内皮細胞におけるストア応答性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) と呼ばれる細胞内 Ca^{2+} 応答において、細胞外アシドーシスは、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出に影響せず、細胞外からの Ca^{2+} 流入のみを可逆的に抑制することが確認された。また、同機序による NO 及び PGI₂ の EDRF 産生も細胞外アシドーシスにより抑制されることが示された。その詳細な機構は今回明らかにされなかったが、細胞外アシドーシス時に細胞内 pH が影響を受けなかったことから、細胞外 H^+ によって惹起される Na^+/H^+ 交換機構を介した細胞内 Na^+ 濃度の減少が、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) を介した外向きの Ca^{2+} 電流を刺激し、アシドーシス時の細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制するという従来の仮説は否定的であった。

以上より申請者らは、細胞外のアシドーシスはストア応答性 Ca^{2+} 流入を抑制することにより、血管内皮機能を抑制するとし、これらの結果は、アシドーシスを生じる様々な病態の解明に有用であるとしている。

審査委員会は、アシドーシス時の血管内皮細胞の応答性の変化を詳細に検討し、ストア応答性

Ca^{2+} 流入が抑制されることにより血管内皮機能が抑制されるという新規の現象を、申請者らが初めて明らかにした点を高く評価した。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) 使用した蛍光色素の蛍光強度に及ぼす pH の影響
- 2) 信号伝達に関わる細胞内酵素に対する pH の影響
- 3) プロピオン酸の作用機序
- 4) ブタ大動脈血管内皮細胞の継代に伴う機能変化について
- 5) 血管内皮細胞の細胞内 Ca^{2+} ストアの特徴について
- 6) BK と TG 刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動パターンの相違とその理由
- 7) TG 刺激下に pH_o 6.4 にすると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が低下する理由
- 8) 実験の N 数はどのように決めたか
- 9) SOCE と、心筋細胞における Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release との相違
- 10) 本機構の生理的意味合いについて

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	浦野 哲盟		
	副査	川上 純一	副査	海野 直樹